

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 03 mai 2000 (03.05.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02243	Référence du dossier du déposant ou du mandataire sCT990058/GK
Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 septembre 1999 (21.09.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 21 septembre 1998 (21.09.98)
Déposant DESCAMPS, Valérie etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

07 avril 2000 (07.04.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Diana Nissen no de téléphone: (41-22) 338.83.38
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C07H 3/06, C12P 19/14, A01N 63/02, C12N 9/14</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 00/17215 (43) Date de publication internationale: 30 mars 2000 (30.03.00)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02243 (22) Date de dépôt international: 21 septembre 1999 (21.09.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/11756 21 septembre 1998 (21.09.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LABORA- TOIRES GOEMAR S.A. [FR/FR]; ZAC de la Madeleine, F-35400 Saint Malo (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DESCAMPS, Valérie [FR/FR]; 22, rue Yan d'Argent, F-29680 Roscoff (FR). KLARSZINSKY, Olivier [FR/FR]; 13, rue des Vos- ges, F-68740 Fessenheim (FR). BARBEYRON, Tristan [FR/FR]; 30, rue de la Garenne, F-29233 Cleder (FR). CLOAREC, Bernard [FR/FR]; Penn ar Feunteun, F-29420 Plouenan (FR). FRITIG, Bernard [FR/FR]; 6, rue Hohwald, F-67460 Souffelweyersheim (FR). JOUBERT, Jean-Marie [FR/FR]; 13, rue Gesril du Papeu, F-35400 Saint Malo (FR). PLESSE, Bertrand [FR/FR]; 23, rue Saint Erhard, F-67000 Strasbourg (FR). YVIN, Jean-Claude [FR/FR]; 3, rue Gabriel Desgrés, F-35400 Saint Malo (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: KOCH, Gustave; Cabinet Plasseraud, 84, rue d'Amsterdam, F-75440 Paris Cedex 09 (FR). (81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: ENDOFUCANASES AND METHOD USING SAME FOR PREPARING FUCO-OLIGOSACCHARIDES FROM FUCANES, BACTERIUM PRODUCING ENDOFUCANASES AND USES OF FUCO-OLIGOSACCHARIDES FOR PLANT PROTECTION</p> <p>(54) Titre: ENDOFUCANASES ET PROCÉDE LES METTANT EN ŒUVRE POUR LA PRÉPARATION DES FUCO-OLIGOSACCHARIDES À PARTIR DES FUCANES, BACTÉRIE PRODUCTRICE DES ENDOFUCANASES ET APPLICATIONS DES FUCO-OLIGOSACCHARIDES À LA PROTECTION DE PLANTES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns endofucanases suitable for preparing fuco-oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of fucanes. It also concerns a bacterium producing endofucanases and the preparation of said enzyme from the bacterium. It further concerns endofucanase genes and it finally concerns the use said fuco-oligosaccharides for plant protection.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention a pour objet des endofucanases propres à la préparation de fuco-oligosaccharides par hydrolyse enzymatique des fucanes. Elle a également pour objet une bactérie productrice des endofucanases et la préparation de cette enzyme à partir de la bactérie. Elle vise, de plus, des gènes d'endofucanases. Elle a enfin pour objet l'application des fuco-oligosaccharides en question à la protection des plantes.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

21/04/99

WO 00/17215

PCT/FR99/02243

1

endofucanases et procede les mettant en oeuvre pour la preparation des fuco-oligosaccharides a partir des fucanes, bacterie productrice des endofucanases et applications des fuco-oligosaccharides a la protection de plantes.

5

L'invention a pour objet des endofucanases propres à la préparation de fuco-oligosaccharides par hydrolyse enzymatique des fucanes

10 Elle a également pour objet une bactérie productrice des endofucanases et la préparation de cette enzyme à partir de la bactérie.

Elle vise, de plus, des gènes d'endofucanases.

Elle a enfin pour objet l'application des fuco-
15 oligosaccharides en question à la protection des plantes.

Les fucanes sont des polysaccharides à base de α -L-fucose.

Ils peuvent être extraits de la paroi des algues brunes.

20 Ils peuvent également être extraits des échinodermes.

On a déjà préparé, par hydrolyse acide ou radicalaire, des fractions oligosaccharidiques à partir des fucanes.

25 Diverses activités biologiques ont été étudiées tant en rapport avec les fucanes qu'en rapport avec certaines fractions de plus faible poids moléculaire.

L'invention vise des fuco-oligosaccharides particuliers, une enzyme pour leur préparation et leurs
30 applications dans le domaine de la protection des plantes.

Les fuco-oligosaccharides en question sont sulfatés et ont un degré de polymérisation de 4 à 100, de préférence de 4 à 20 unités α -L fucose; deux d'entre eux sont caractérisés par les formules développées I et II

représentées à la figure 1.

Conformément à l'invention, ils sont préparés par hydrolyse enzymatique à partir des fucanes en faisant agir sur ceux-ci des endofucanases, c'est-à-dire des enzymes que
5 la Société Demanderesse a eu le mérite d'isoler.

Ces enzymes sont secrétées par une souche bactérienne à activité fucanolytique que la Société Demanderesse a obtenue à partir des boues industrielles utilisées pour le traitement des effluents, riches en
10 fucanes sulfatés, d'une usine d'extraction d'alginate.

Pour ce faire, elle a procédé comme suit.

Des boues, prélevées dans les bassins d'oxygénation et de décantation d'une station d'épuration située en aval d'une usine d'extraction d'alginate, sont utilisées comme
15 inoculum d'un milieu pauvre à base d'eau de mer filtrée contenant 2 g/l de fucane.

En travaillant sur des parties aliquotes du milieu de culture ainsi constitué, on effectue chaque jour le test dit "à l'albumine sérique bovine" en milieu acide(ou BSA).

20 Le principe de ce test est fondé sur le fait que les polysaccharides anioniques s'associent, en milieu acide, avec l'albumine chargée positivement, provoquant ainsi une précipitation de l'ensemble des complexes formés.

Au contraire, les oligosaccharides et les oses ne
25 sont pas précipités ou flocculés car ils sont de trop faible poids moléculaire pour donner lieu à la formation d'un complexe insoluble.

En vue du test BSA, on introduit 600 µl du surnageant de culture dans un microtube de 1 ml et on
30 centrifuge.

Le surnageant, à savoir 500 µl, est transféré dans un autre tube et mélangé à 2 ml de solution de BSA acide constituée par 3,26 g d'acétate de sodium, 4,56 ml d'acide acétique glacial et 1 g de BSA dans 1 l d'eau distillée, le

pH étant de 3,72 à 3,78.

On traite parallèlement un témoin qui est constitué par 500 µl de surnageant de culture sans inoculum.

Compte tenu des explications qui précèdent, la formation d'un trouble identique à celui qui se produit dans le témoin indique qu'il n'y a pas eu de dégradation du polymère; par contre, dans le cas où le trouble est moindre ou inexistant, on conclut à la présence, dans la culture bactérienne, d'une activité enzymatique spécifique du fucane.

Le test s'est avéré positif au bout de 7 jours d'incubation du fucane en présence de l'inoculum décrit plus haut.

Une partie aliquote du milieu de culture correspondant est alors étalée sur boîte de Pétri contenant le milieu connu sous l'appellation Zobell-Fucane, qui est constitué par le milieu Zobell (1941) additionné de fucane à 2 g/l et solidifié par de l'agar à 15 g/l.

La composition du milieu Zobell [Zobell CE(1941) "Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes" paru dans *J. Mar. Res.*, 4 : 41-75] est comme suit:

Bacto-peptone Difco	5,0 g
Extrait de levure Difco	1,0 g
Eau de mer filtrée	800 ml
Eau distillée	q.s.p. 1 l

On constate la formation dans la boîte de Pétri d'un certain nombre de colonies différentes les unes des autres et qui correspondent à autant de souches.

Chacune de ces colonies, autrement dit chacune des souches, est isolée à partir de ce milieu et introduite dans un milieu liquide Zobell-Fucane constitué par 1/2 volume de Zobell et 1/2 volume d'une solution de fucane à 4 g/l dans de l'eau de mer filtrée.

Sur chacune des souches ainsi isolées et introduites

dans le milieu Zobell-Fucane, on effectue le test BSA pour détecter les souches fucanolytiques.

Lorsque le test est positif, la souche est repiquée sur milieu Zobell-Fucane pour vérifier qu'elle continue à hydrolyser les fucanes du nouveau milieu; si tel est le cas, cela signifie que tout le dispositif génétique nécessaire à la production des fucanases est mis en place; on dit alors que la souche est induite par le substrat; autrement dit, la présence de fucanes dans le milieu induit la production des enzymes par la souche. En raison de cet état de choses, le test BSA est de nouveau effectué sur la nouvelle culture.

En procédant ainsi, on a isolé une souche qui a été dénommée SW5 et qui donne un test BSA positif au bout de 3 à 4 jours lorsqu'elle est cultivée sur milieu Zobell-Fucane.

La susdite souche SW5, sélectionnée de la manière venant d'être décrite, a été déposée sous le n° 12171 dans la collection DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) dont l'adresse est la suivante: Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Allemagne.

La souche est en bâtonnet Gram négatif, aérobie stricte, chimioorganotrophe et hétérotrophe. Au bout de trois jours de culture, les colonies sur milieu Zobell-Fucane solide sont petites (1 mm de diamètre) et pigmentées en orange. La souche SW5 nécessite de l'eau de mer pour sa croissance, sa température optimale de croissance se situant autour de 18-20°C. Aucune croissance n'est constatée en dessous de 15°C et au-dessus de 25°C. D'autres caractéristiques phénotypiques de la souche SW5 sont montrées dans le tableau I ci-après.

TABLEAU I**Caractères physiologiques et biologiques de la souche SW5**

Caractères positifs	Caractères négatifs	Caractères négatifs (suite)
catalase α -cyclodextrine dextrine glycogène cellobiose D-fructose L-fucose D-galactose gentobiose α -D-glucose α -D-lactose maltose D-mannose β -méthyl-D-glucoside turanose mono-méthyl-succinate D-galacturonate D-glucuronate D,L-lactate L-alanine L-alanyl-glycine L-asparagine aspartate L-glutamate glycyl-L-aspartate glycyl-L-glutamate L-ornithine L-proline L-thréonine urocanate glucose-1-phosphate glucose-6-phosphate	oxydase flexirubine réduction des nitrates formation d'indole fermentation arginine dihydrol uréase tween 40 tween 80 N-acétyl-D-galactosamine N-acétyl-D-glucosamine adonitol L-arabinose D-arabitol érythritol m-inositol lactulose D-mannitol D-mélibiose D-psicose D-raffinose L-rhamnose D-sorbitol sucrose D-tréhalose xylitol méthyl pyruvate acétate cis-aconitate citrate formate D-galactanate lactone D-gluconate D-glucosamine	α -hydroxybutyrate β -hydroxybutyrate γ -hydroxybutyrate p-hydroxyphénylacétate itaconate α -kétobutyrate α -kétooglutarate α -kétovalérate malonate propionate quinat D-saccharate sébacate succinate bromosuccinate succinamate glucuronamate alininamide D-alanine L-histidine D,L-carnitine γ -aminobutyrate inosine uridine thymidine phényléthylamine putrescine 2-aminoéthanol 2,3-butanediol glycérol D-,L- α -glycérol phosphate

5

Les relations phyllogénétiques, de la souche SW5 ont été établies par la séquence nucléotidique ID No.1 du gène codant pour l'ARN 16S.

La comparaison de la séquence de ce gène avec les gènes homologues issus de bactéries du groupe CFB (Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides) a permis de construire un arbre phylogénétique dont il résulte que la

10

souche appartient à la famille des *Flavobacteriaceae* (Bernardet et al, 1996, International Journal of Systematic Bacteriology, Jan: 128-148) et qu'elle est proche de *Gelidibacter algens* (Bowman et al, 1997, International
5 Journal of Systematic Bacteriology, July: 670-677), une souche isolée des glaces de l'Antarctique.

Il s'ensuit que le procédé conforme à l'invention pour la préparation des susdits fuco-oligosaccharides est caractérisé par le fait que l'on soumet un substrat constitué
10 par une matière première à base de fucanes à une hydrolyse enzymatique à l'aide d'une enzyme fucanolytique ou endofucanase susceptible d'être obtenue à partir d'une souche bactérienne déposée sous le N° 12171 dans la collection DSMZ.

15 La bactérie SW5 secrète dans son milieu de culture des quantités significatives d'activité fucanase, pouvant être utilisées à température ambiante, en milieu tamponné à pH 7,5, voire dans l'eau.

La préparation du substrat, autrement dit des
20 fucanes qui doivent être soumis à l'action de l'activité enzymatique, est effectuée comme suit.

On soumet 150 kg d'algue brune *Pelvetia canaliculata* à un broyage en vue d'obtenir des fragments de 2,5 à 3 mm, en utilisant un dispositif désigné par Comitrol 2100 et
25 commercialisé par la Société Urschel.

Ces fragments sont soumis à une extraction par 800 l d'acide chlorhydrique 0,01 N contenant 4% en poids de CaCl_2 en maintenant une agitation pendant 3 heures à 70°C.

La suspension de fragments d'algue ainsi traitée est
30 décantée pendant 2 h.30 et le rétentat obtenu est centrifugé; le surnageant de l'opération de centrifugation est soumis à une ultrafiltration tangentielle sur des membranes de 50 kDa. Le rétentat obtenu à l'issue de cette ultrafiltration tangentielle est atomisé à l'aide d'un

dispositif désigné par l'appellation Miro et commercialisé par la Société Minor Production.

Le résultat de cette atomisation est une poudre constituée majoritairement par des fucanes.

5 Cette poudre est soumise à une purification supplémentaire par remise en solution, centrifugation, précipitation du surnageant à l'éthanol, remise en solution du précipité dans l'eau et ultrafiltration tangentielle de la solution aqueuse sur des membranes de 30000 Da.

10 Le rétentat issu de cette ultrafiltration est soumis à une lyophilisation et constitue le substrat recherché; on le désigne par FS28EtOH.

 Ce substrat, autrement dit cette poudre de fucanes, est soumis à l'activité enzymatique obtenue à partir de la
15 bactérie SW5.

 Pour ce faire, on prépare une solution à 1 g/l de substrat FS28EtOH dans du tampon Tris (20 mM, pH 7,5); on prélève 50 µl de cette solution et on la mélange à 10 µl de la fraction protéique à tester qui contient l'activité
20 enzymatique obtenue à partir de la bactérie SW5.

 Le mélange est maintenu pendant 1 heure à température ambiante.

 L'hydrolysate final contient le mélange de fuco-oligosaccharides en question.

25 Cet hydrolysate est soumis à une électrophorèse en vue de mettre en évidence de façon qualitative la présence de fractions oligosaccharidiques; cette électrophorèse est effectuée sur gel de polyacrylamide en utilisant la technique dite C-PAGE décrite par Zablackis E. et Perez J.
30 (1990) dans l'article intitulé "A partially pyruvated carrageenan from Hawaiian *Grateloupia filicina* (Cryptonemiales, Rhodophyta) paru dans "Bot. Mar." 33: 273-276.

 Les profils de dégradation des fucanes obtenus à l'aide de l'enzyme produite par la bactérie SW5 montrent que

l'activité enzymatique de la souche en question est de type endolytique; il a été remarqué au cours des essais que les fucanes présentent des éléments de structure semblables quelle que soit l'algue brune dont ils sont extraits.

5 L'activité endo-fucanase de la souche SW5 a été purifiée à l'homogénéité électrophorétique; on a déterminé que la protéine en question a une masse moléculaire d'environ 105 kDa.

Trois peptides internes ont alors été micro-
10 séquencés.

On a ainsi obtenu les microséquences ID No.2, ID No.3 et ID No.4.

L'invention vise également les endofucanases caractérisées par le fait qu'ils contiennent des séquences
15 analogues aux peptides ID No.2, ID No.3, ID No. 4 et/ou ID No. 6 ainsi que les gènes d'endofucanase caractérisés par le fait qu'ils contiennent des séquences analogues à la séquence nucléotidique ID No. 5.

La purification de l'activité endo-fucanase dont il
20 a été question plus haut, a été effectuée à l'aide d'un système commercialisé sous l'appellation FPLC[®] par la Société Pharmacia; ce système a été placé à 4°C.

Après cinq jours de culture de la souche SW5 dans
6 l de milieu Zobell-Fucane, on procède à une micro-
25 filtration sur un dispositif du type Pellicon de la Société Millipore équipé d'une cassette de 0,45 µm (Millipore) puis à une ultrafiltration tangentielle sur une cassette PTGC de 30 000 Da.

→ Pour le fractionnement des protéines, on procède de
30 la façon suivante:

Pour le premier fractionnement de 0 à 40%, on ajoute à la solution protéique du (NH₄)₂SO₄ à 242 g/l petit à petit et sous agitation lente à 4°C. Lorsque tout le sulfate d'ammonium est dissous, la solution est centrifugée; le

culot, qui représente la fraction entre 0 et 40% n'est pas conservé tandis que le surnageant est soumis à un nouveau fractionnement de 40 à 60%. Ce fractionnement est réalisé par addition de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 130 g/l petit à petit et sous
5 agitation lente à 4°C. Lorsque les cristaux sont dissous, la solution est centrifugée; le culot, qui représente la fraction protéique entre 40 et 60% de saturation du sulfate d'ammonium, est conservé et resolubilisé dans le tampon Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, CaCl_2 5 mM, MgCl_2 5 mM.

10 La fraction entre 40 et 60% de saturation du sulfate d'ammonium est diluée 20 fois dans du tampon Tris 20 mM pH 7,5 et resaturée à 40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

L'échantillon ainsi obtenu est injecté sur une colonne de chromatographie d'interaction hydrophobe à base
15 de Phenyl Sepharose CL4B Pharmacia à raison de 1 ml/min.

La colonne est préalablement équilibrée avec du tampon Tris pH 7,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 40%. Le gradient s'effectue par diminution de la concentration en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 1,8 M (40%) à 0 M dans du tampon Tris en 3 volumes de colonne,
20 puis par 2 volumes de tampon sans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Chaque fraction protéique est utilisée pour hydrolyser le fucane FS28EtOH. L'hydrolysate est préparé comme décrit précédemment par ajout de ladite fraction à une solution de fucane à 1 g/l dans du tampon Tris 20 mM pH 7,5
25 contenant des sels. L'hydrolysate est alors testé par la technique C-PAGE. Les fractions dites "positives sur C-PAGE" sont celles qui génèrent un profil électrophorétique contenant des fractions d'oligo-fucosaccharides.

Les fractions qui génèrent un profil de dégradation
30 positif sur gel de polyacrylamide sont rassemblées et diluées 5 fois dans du tampon Tris 20 mM pH 7,5; NaCl 5 mM avant d'être injectées sur une colonne de chromatographie d'échange d'anions chargée en DEAE Sepharose CL6B commercialisé par la Société Pharmacia.

Les protéines sont éluées par un gradient de NaCl de 5 mM à 1 M en 3 volumes de colonne, à 1 ml/min.

Ces fractions sont ensuite injectées à raison de 100 µl sur une colonne de filtration, chargée de gel
5 Superdex 200 commercialisé par la Société Pharmacia et
préalablement équilibrée à raison de 0,5 ml/min dans du
tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7,0; NaCl 150 mM.

La fraction active, identifiée par la technique
C-PAGE, est recueillie et la pureté de la protéine est
10 déterminée sur un gel SDS à 12,5% en utilisant le dispositif
Phast-System® de la Société Pharmacia. Les marqueurs
moléculaires utilisés sont les standards de 14,5 à 200 kDa
commercialisés sous l'appellation « broad-range » par la
Société Biorad.

15 A partir des microséquences protéiques SEQ ID N° 3
et SEQ ID N° 4, on a synthétisé des oligonucléotides ; on a
utilisé ces oligonucléotides comme amorces afin de
synthétiser par PCR (Polymerase Chain Reaction) un fragment
du gène codant pour la fucanase, l'ADN purifié de la souche
20 SW5 servant de matrice à la réaction.

Les produits de PCR spécifiques des couples
d'amorces ont été séquencés.

L'un d'entre eux présente la séquence nucléotidique
SEQ ID N° 5.

25 La séquence protéique déduite, longue de 67 acides
aminés, contient les microséquences SEQ ID N°3 et SEQ ID
N°4, indiquant qu'il s'agit d'un fragment de la fucanase de
la souche SW5.

La séquence nucléotidique SEQ ID N° 5 est donc une
30 portion du gène, longue de 203 nucléotides, qui code pour la
fucanase de la souche SW5.

Pour la préparation des fuco-oligosaccharides, on
peut avoir recours à plusieurs méthodes dont deux sont
décrites ci-après.

Dans une première méthode, on laisse agir l'enzyme jusqu'à consommation complète du substrat; on incube pendant 24 heures un fucoïdane de *Pelvetia canaliculata* en présence de l'enzyme partiellement purifiée, puis on ultrafiltre les produits d'hydrolyse sur membrane de 500 Da. On obtient ainsi une fraction désignée par I27.

Du point de vue pratique, on hydrolyse un fucane extrait de *Pelvetia canaliculata* (fraction FS28EtOH) à la température ambiante pendant 24 heures, en ajoutant à 1 litre de substrat d'une concentration de 5 g/l dans le tampon Tris 20 mM pH 7,5; NaCl 50 mM; MgCl₂ 5 mM; CaCl₂ 5 mM, une quantité de 30 ml de précipité d'enzyme au sulfate d'ammonium 40-60% (3,02 mg de protéines).

L'hydrolysate ainsi obtenu est complété par de l'eau distillée jusqu'à 20 l, puis ultrafiltré sur un système d'ultrafiltration tangentielle de 10 000 Da en utilisant une cassette 0,46 m² PTGC de la Société Millipore avec une pression d'entrée de 6,5 bars et une pression de sortie de 5,5 bars.

L'ultrafiltrat ainsi obtenu est récupéré et de nouveau ultrafiltré sur 500 Da en utilisant le dispositif commercialisé sous la marque Omega Centraset OM500DC05 par la Société Pall Filtron avec 1 bar en entrée de circuit et une pression nulle de sortie; cette nouvelle ultrafiltration tangentielle vise à dessaler l'ultrafiltrat.

En vue de fractionner les oligomères, le rétentat est de nouveau ultrafiltré sur 500 Da mais avec des pressions d'entrée de 2,5 bars et 2 bars à la sortie.

Le filtrat qui passe le seuil de coupure de 500 Da (environ 20 l) de la membrane est ensuite concentré sur évaporateur rotatif, neutralisé au carbonate d'ammonium puis lyophilisé en utilisant le dispositif commercialisé sous la marque Lyolab A LSL par la Société Secfroid. Le lyophilisat ainsi obtenu contient les oligofucanes appelés I27.

Les oligofucanes de la fraction I27 ainsi obtenus ont été soumis à un fractionnement supplémentaire par chromatographie d'échange d'ions et chromatographie d'exclusion.

5 Le chromatogramme d'exclusion obtenu sur un gel de la marque BIOGEL P6 est reproduit sur le graphique de la figure 2 qui montre en abscisse le volume d'élution (V_e) exprimé en ml et en ordonnées l'indice réfractométrique (RI) de l'éluat.

10 La structure des oligosaccharides ainsi obtenus (pics 1A à 4A du chromatogramme) a été analysée par RMN bidimensionnelle.

Il s'agit, dans le cas des pics 4A et 3A, respectivement d'un tétrasaccharide et d'un hexasaccharide
15 formés par des résidus de fucose alternativement reliés par des liaisons $\alpha(1 \rightarrow 3)$ et $\alpha(1 \rightarrow 4)$ et sulfatés sur leur carbone 2 (figure 1).

Les pics 2A et 1A sont, quant à eux, constitués par des mélanges de DP variable d'oligosaccharides de la même
20 série homologue, mais pouvant comporter des branchements.

Ce résultat suggère que les polysaccharides de départ sont constitués, au moins partiellement, par la répétition de motifs α -L-Fuc-2-sulfate- $1 \rightarrow 3$ - α -L-Fuc-2-sulfate- $1 \rightarrow 4$ non décrits à ce jour.

25 Une deuxième méthode comporte une hydrolyse en continu; elle consiste, à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration de 30 kDa, à soustraire à l'action de l'enzyme les oligofucanes à mesure de leur formation. La fraction ainsi obtenue est désignée par "fraction I25" et
30 contient des oligofucanes de masse moléculaire plus élevée que ceux constituant la fraction I27.

Du point de vue pratique, on dissout le substrat (50 g de FS28EtOH) dans 10 litres d'eau distillée.

Pour effectuer l'hydrolyse, on ajoute 25 ml d'enzyme

sous forme d'une fraction précipitée au sulfate d'ammonium entre 40 et 60% de saturation, dans 2 litres de substrat; l'ultrafiltration en continu est engagée après 30 minutes.

Pour cette ultrafiltration tangentielle, on utilise
5 un appareil de marque Pellicon comportant une cassette de 30 000 Da, ledit appareil étant réglé sur 1 bar en entrée et 0 bar en sortie pendant toute la durée de l'hydrolyse.

→ La sortie du filtrat est partiellement fermée pour maintenir le débit de filtration à 2 l/h.

10 Les caractéristiques de l'enceinte réactionnelle sont choisies de façon à permettre un approvisionnement de l'enzyme en substrat jusqu'à épuisement des 10 litres et le maintien d'un volume fixe d'hydrolyse de 2 litres.

L'hydrolyse est poursuivie en ajoutant de l'eau
15 distillée (8 litres) en continu jusqu'à ce que le filtrat ne contienne plus d'oligomères.

On obtient 18 litres d'un ultrafiltrat qui est concentré jusqu'à environ 1 litre à l'aide d'un appareil Pellicon équipé d'une cassette de 500 Da, la pression
20 d'entrée étant de 2 bars et la pression de sortie de 0; une concentration supplémentaire jusqu'à 200 ml est effectuée par évaporation rotative, puis le concentrat est neutralisé et lyophilisé.

Le filtrat, qui contient les fractions de faible
25 poids moléculaire (c'est-à-dire capable de passer sur une membrane au seuil de coupure de 500 Da) n'a pas été conservé.

La fraction I25 désigne les oligofucanes retenus entre les seuils de coupure de 500 Da et 30000 Da.

On a étudié l'activité biologique des fractions I27
30 et I25 sur les plantes.

L'effet éliciteur direct de ces fractions a été analysé sur des cultures de cellules de Tabac BY.

Cinq marqueurs des réactions de défense ont été testés indépendamment, à savoir:

- l'alcalinisation du milieu de culture (réponse précoce couramment observée lorsque les plantes sont incubées en présence d'éliciteurs oligosaccharidiques),
- les niveaux d'activité "phénylammonia lyase" (PAL) 5 qui est une enzyme clé pour la synthèse des phytoalexines chez les plantes,
- les niveaux d'activité O-méthyl transférase (OMT) qui est une enzyme impliquée dans la synthèse de lignine,
- les niveaux d'activité lipoxygénase (LOX) qui est 10 une enzyme impliquée dans la génération de jasmonate de méthyle, un élément des cascades de signalisation aboutissant à l'activation de gènes de défense et
- les teneurs en acide salicylique (SA) qui est un autre messager secondaire impliqué dans les réactions de 15 défense.

La fraction I27, administrée à une dose de 200 mg/l, induit une alcalinisation du milieu de culture des cellules de tabac de 1 à 1,5 unités pH. Par rapport aux cellules non traitées, les activités PAL et OMT sont stimulées 20 respectivement d'un facteur 50 à 600 et 2,0 à 2,8, entre 4 heures et 8 heures après l'addition de I27 au milieu de culture.

L'activité LOX, mesurée 18 heures après l'addition de I27 à la dose de 200 mg/l est 7 fois plus importante que 25 dans les cellules témoins. De même, 3 heures après le début du traitement, les teneurs en acide salicylique sont 70 fois plus importantes que dans les cellules non traitées.

Des résultats analogues ont été observés avec la fraction I25. On note toutefois une stimulation plus forte 30 de l'activité LOX, jusqu'à un facteur multiplicatif de 55 par rapport aux cellules témoins.

La figure 3 illustre l'influence de la fraction I25 sur la stimulation de l'activité PAL dans les cellules de tabac BY; elle montre la variation de l'activité exprimée en

pico-katal par g (pKat/g) de masse fraîche de suspension cellulaire en fonction du temps exprimé en heures pour trois concentrations, à savoir 200 mg/l, 50 mg/l et 10 mg/l et pour un témoin.

5 L'examen de la figure 3 montre que des concentrations de 10 mg/l sont suffisantes pour déceler une stimulation significative par rapport aux cellules témoins non élicitées et on observe une saturation de la réponse pour les concentrations supérieures à 50 mg/l.

10 Les résultats de ces expériences montrent que les oligofucanes conformes à l'invention sont reconnus comme des éliciteurs par les cellules de tabac.

Par rapport à des cellules non traitées, ils stimulent très fortement (c'est-à-dire dans des proportions
15 tout à fait comparables à celles d'autres éliciteurs comme les oligopectines et les oligo β 1-3 glucanes), les activités PAL, LOX et OMT ainsi que les teneurs en SA.

L'effet éliciteur de la fraction I25 a également été analysé sur des suspensions cellulaires de blé.

20 On montre que cette fraction induit l'activité PAL.

Ainsi, à la concentration de 200 mg/l, I25 a stimulé d'un facteur 15 à 20 l'activité PAL entre 2 et 6 heures après le traitement.

Une dose de 50 mg/l stimule encore l'activité PAL
25 d'un facteur 4, 4 heures après le traitement.

I25 induit également l'activité PAL dans les suspensions cellulaires de persil.

A 200 mg/l I25 a stimulé d'un facteur 15 à 30 l'activité PAL entre 4 et 6 heures après le traitement.

30 Une dose de 20 mg/l stimule encore l'activité PAL d'un facteur 5, 4 heures après le traitement.

Par une autre série d'expériences, on montre que, infiltrés dans les feuilles de tabac, les fuco-oligosaccharides protègent contre le VMT (virus de la

mosaïque du tabac). Les expériences ont été réalisées comme suit.

La fraction de fuco-oligosaccharides dénommée I25 (200 mg/l) est infiltrée à l'aide d'une seringue dans trois
5 feuilles de tabac (feuilles 4, 5 et 6 en partant du bas) de 2 mois d'âge.

Cinq jours après l'infiltration, une inoculation au VMT est réalisée dans les feuilles 5, 6 et 7, la feuille 4 servant de témoin.

10 Une semaine après l'inoculation, on détermine le nombre de lésions (NL) et la taille de ces lésions (TL) sur les feuilles des plants traitées ainsi que sur des plants traités à l'eau uniquement.

15 Dans le tableau II ci-après sont représentés les pourcentages de protection, selon les deux critères définis ci-dessus.

TABLEAU II

Protection du tabac contre le VMT par les fuco-oligosaccharides

20

	% protection (NL)	% protection (TL)
Feuille 5	65	25
Feuille 6	65	35
Feuille 7	40	26

La feuille 4 ne présente aucune lésion.

Des résultats réunis dans ce tableau, on peut conclure que l'on a bien induit une protection dans les
25 feuilles infiltrées par I25 (feuilles 5 et 6), mais aussi dans la feuille 7, qui n'avait pas reçu de fuco-oligosaccharides.

On peut donc parler de protection systémique.

De ces deux séries d'expériences sur le blé, le persil et le tabac, il ressort que les fuco-oligosaccharides stimulent des activités enzymatiques marqueurs des défenses naturelles non seulement dans le cas du tabac, mais également dans le cas du blé et du persil.

Cette stimulation aboutit à une protection systémique contre le VMT et, vraisemblablement, contre d'autres agents phytopathogènes.

A titre illustratif, on donne ci-après deux exemples.

EXEMPLE 1

Concentré liquide pour l'agriculture à base d'oligofucanes:

15	Oligofucane I25	0,200 kg
	Tween 801	0,005 kg
	Méthylparaben sodé	0,005 kg
	Eau	<u>0,790 kg</u>
	Total	1,000 kg

20 Ce concentré est utilisé après dilution dans 1000 litres d'eau d'une quantité comprise entre 10 g et 10 kg, de préférence entre 20 g et 5 kg et plus préférentiellement entre 100 g et 1 kg ; cette dilution présente une teneur en oligofucanes I25 comprise entre 2 et 2000 g, de préférence
25 entre 20 et 200 g pour 1000 litres d'eau.

EXEMPLE 2

Poudre concentrée soluble contenant, en tant que matière active, l'hydrolysate I27 ainsi que des adjuvants.

30 Pour 1 kg en poids/poids, la constitution de cette poudre est définie comme suit :

	Oligofucane I27	0,200 kg
	Kaolin	0,495 kg
	Mannose	0,050 kg
	Méthylparaben sodé	0,005 kg
5	Amidon purifié	<u>0,250 kg</u>
	Total	1,000 kg

Cette poudre est utilisée après dilution dans une
quantité d'eau suffisante pour obtenir une composition dont
la teneur en oligofucane I27 est comprise entre 2 et 5000 g,
10 de préférence entre 20 g et 100 g pour 1000 litres d'eau.

REVENDICATIONS

1. Souche bactérienne en bâtonnet Gram négatif déposée sous le N° 12171 dans la Collection DSMZ.

5 2. Endofucanase susceptible d'être obtenue à partir de la souche bactérienne selon la revendication 1.

3. Endofucanases caractérisées par le fait qu'elles contiennent des séquences analogues aux peptides ID No. 2, ID No. 3, ID No. 4 et/ou ID No. 6.

10 4. Gènes d'endofucanase caractérisés par le fait qu'ils contiennent des séquences analogues à la séquence nucléotidique ID No. 5.

5. Procédé de préparation de fuco-oligosaccharides sulfatés dont le degré de polymérisation est de 4 à 100, de
15 préférence de 4 à 20 unités α -L fucose, plus particulièrement de fuco-oligosaccharides répondant aux formules (I) et (II) représentées à la figure 1, caractérisé par le fait qu'il comporte une étape d'hydrolyse enzymatique mettant en oeuvre au moins une endofucanase selon l'une des revendications 2
20 et 3.

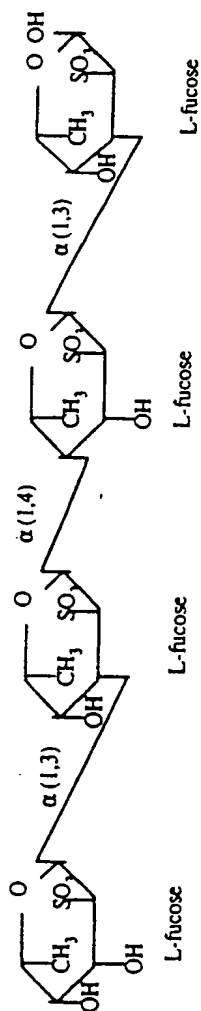
6. Composition phytopharmaceutique pour la protection des plantes comprenant une quantité efficace de fuco-oligosaccharides sulfatés dont le degré de polymérisation est de 4 à 100, de préférence de 4 à 20 unités α -L fucose, plus
25 particulièrement de fuco-oligosaccharides répondant aux formules (I) et (II) représentées à la figure 1 ou obtenus par mise en œuvre du procédé selon la revendication 5.

7. Utilisation pour un traitement de protection des plantes, de fuco-oligosaccharides sulfatés dont le degré de
30 polymérisation est de 4 à 100, de préférence de 4 à 20 unités α -L fucose, plus particulièrement de fuco-oligosaccharides répondant aux formules (I) et (II) représentées à la figure 1 ou obtenus par mise en œuvre du procédé selon la revendication 5.

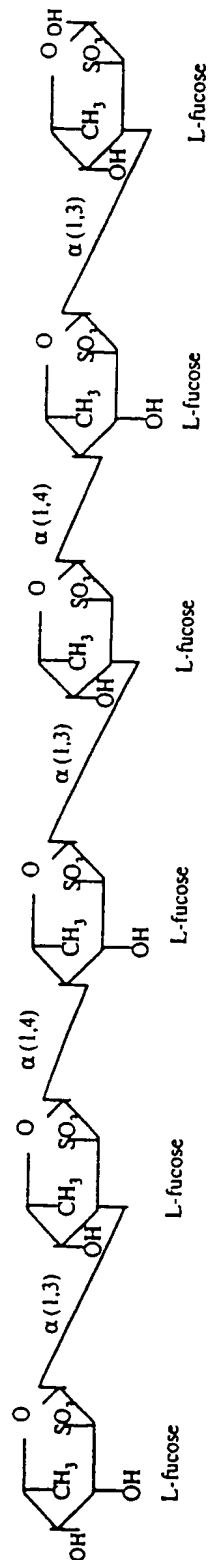
1/2

FIG. 1

I



II



2/2

FIG. 2

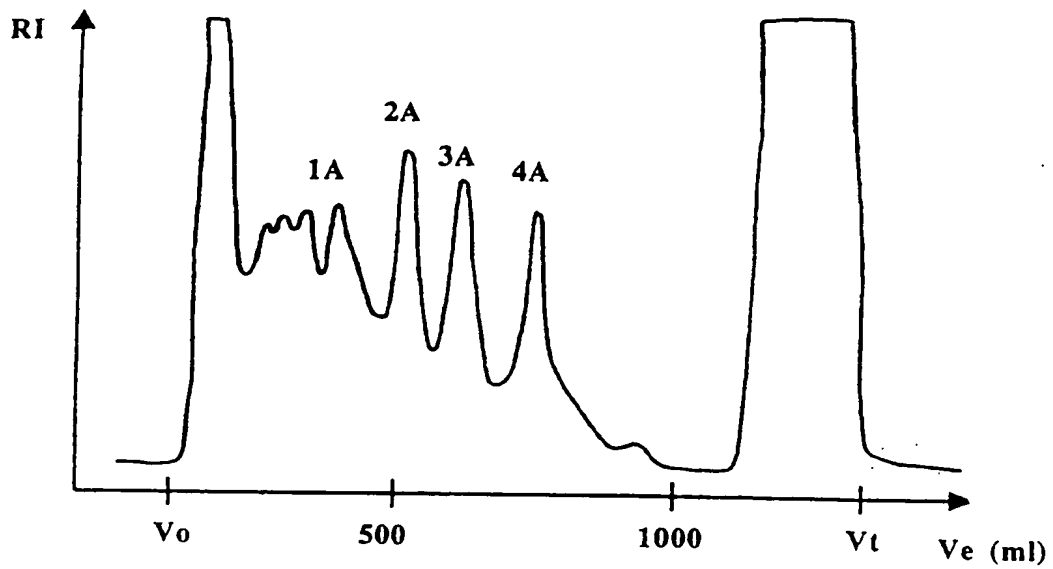
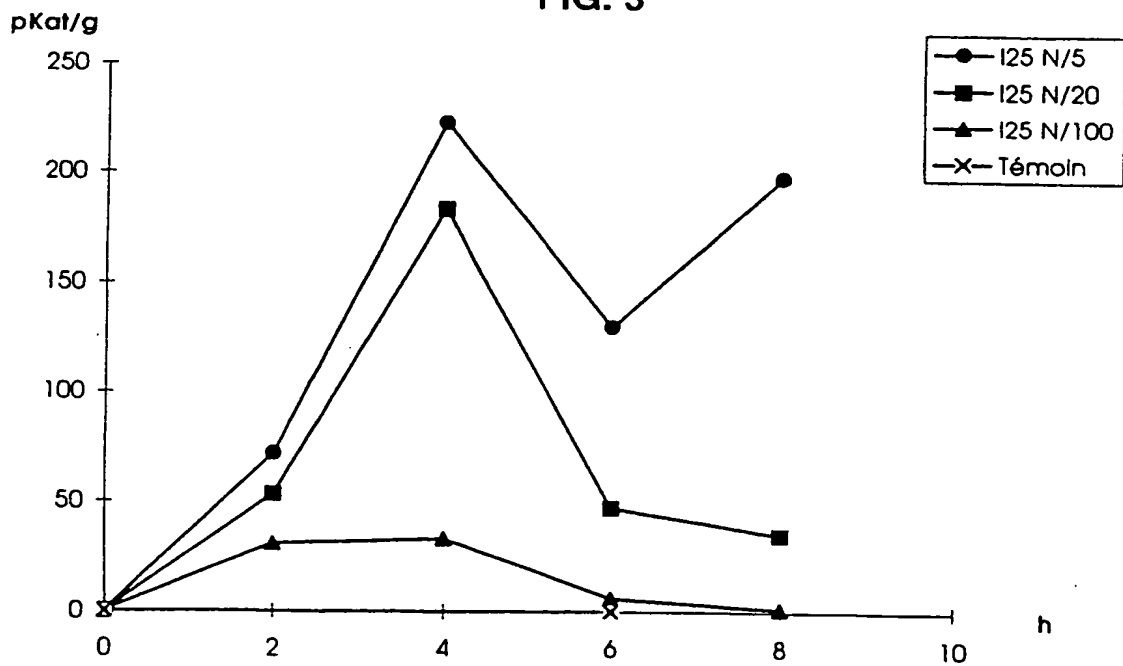


FIG. 3



LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Laboratoires GOËMAR S.A.
- (B) RUE: ZAC de la Madeleine
- (C) VILLE: SAINT MALO
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 35400
- (G) TELEPHONE: +33 2 99 21 53 70
- (G) TELEFAX: +33 2 99 8256 17
- (G) TELEX:

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Fuco-oligosaccharides, enzyme pour leur préparation à partir des fucanes, bactérie productrice de l'enzyme et applications des fuco-oligosaccharides à la protection des plantes.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: disquette
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL:

(v) DONNEES DE LA DEMANDE ACTUELLE:

NUMERO DE LA DEMANDE:
DATE DE DEPOT: 21 septembre 1998

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1474 nucléotides
- (B) TYPE: séquence nucléotidique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double brin
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: gène de l'ARN 16S

(iii) HYPOTHETIQUE: non

(iv) ANTI-SENS: non

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: CNRS, Station Biologique, Laboratoire de Biologie cellulaire et moléculaire des algues, 29682 Roscoff Cedex
- (B) SOUCHE: SW5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AGAGTTTGAT	CNTGGCTCAG	GATGAACGCT	AGCGGCAGGC	CTAACACATG	CAAGTCGAGG	060
GGTAGAGAGA	GCTTGCTTTT	CTTGAGACCG	GCGCACGGGT	GCGTAACGCG	TATACAATCT	120
GCCTCTTACT	GCGGGATAGC	CCAGAGAAAT	TTGGATTAAT	ATCGCATAGC	ATAACGACCC	180
CGCATGGGAT	GTTATTAAAG	GTTACGGTAA	GAGATGAGTA	TGCGTTCTAT	TAGCTAGATG	240
GAGTGGTAAC	GGCACACCAT	GGCAACGATA	GATAGGGGCC	CTGAGAGGGG	GATCCCCCAC	300
ACTGGTACTG	AGACACGGAC	CAGACTCCTA	CGGGAGGCAG	CAGTGAGGAA	TATTGGACAA	360
TGGAGGCAAC	TCTGATCCAG	CCATGCCGCG	TGCAGGAAGA	CGGCCCTATG	GGTTGTAAAC	420
TGCTTTTATA	CGGGAAGAAA	CACCGCTACG	TGTAGCCTTT	GACGGTACCG	TAAGAATAAG	480
GATCGGCTAA	CTCCGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAATACGGAG	GATCCAAGCG	TTATCCGGAA	540
TCATTGGGTT	TAAAGGGTCC	GTAGTGATG	ATTAAGTCAG	AGGTGAAATC	CTGCCGCTCA	600
ACGGTAGAAT	TGCCTTTGAT	ACTGGTTATC	TTGAATCAAT	GTGAAGTGGT	TAGAATATGT	660
AGTGTAGCGG	TGAAATGCAT	AGATATTACA	TAGAATACCA	ATTGCGAAGG	CAGATCACTA	720
ACATTGTATT	GAACTGATG	GACGAAAGCG	TGGGGAGCGA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	780
AGTCCACGCC	GTAAACGATG	GATACTAGCT	GTTCCGATTT	ATCTGAGTGG	CTAAGCGAAA	840
GTGATAAGTA	TCCCACCTGG	GGAGTACGTT	CGCAAGAATG	AAACTCAAAG	GAATTGACGG	900
GGGCCCCGAC	AAGCGGTGGA	GCATGTGGTT	TAATTCGATG	ATACGCGAGG	AACCTTACCA	960
GGGCTTAAAT	GTAAGTTGCA	TTAGGTGGAG	ACACTTATTT	CTTCGGACCA	TCTACAAGGT	1020
GCTGTCATGGT	TGTCGTCAGC	TCGTGCCGTG	AGGTGTCAGG	TTAAGTCCTA	TAACGAGCGC	1080
AACCCCCGTT	GTTAGTTGCC	AGCGAGTCAT	GTCGGGAACT	CTANCAAGAC	TGCCAGTGCA	1140
AACTGTGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAAA	TCATCACGGC	CCTTACGTCC	TGGGCTACAC	1200
ACGTGCTACA	ATGGTAGGGA	CAGAGAGCAG	CCACTGGGCG	ACCAGGAGCG	AATCTATAAA	1260
CCCTATCACA	GTTCGGATCG	GAGTCTGCAA	CTCGACTCCG	TGAAGCTGGA	ATCGCTAGTA	1320
ATCGCATATC	AGCCATGATG	CGGTGAATAC	GTTCCCGGGC	CTTGTAACA	CCGCCCCGTCA	1380
AGCCATGGAA	GCTGGGAGTG	CCTGAAGTCC	GTCACCGCAA	GGAGCGGCCT	AGGGTAAAT	1440
CGGTAAGTAG	GGCTAAGTCG	TAACAAGGTG	TCCG			1474

(3) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 15 acides aminés
- (B) TYPE: séquence peptidique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple brin
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: non

(iv) ANTI-SENS: non

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: CNRS, Station biologique, Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire des algues, 29682 Roscoff Cedex
- (B) SOUCHE: SW5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Gln	Thr	Ala	Asn	Thr	Thr	Tyr	Gly	Ile	Asn	Thr	Val	Ala	Ser	Met
				5						10				15

(4) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 acides aminés
(B) TYPE: séquence peptidique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple brin
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Thr Ser Gly Pro Asp Trp Leu Thr Ile Gln Gln Thr Asp Ala Asn Ser
5 10 15
Gly Lys

(5) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 acides aminés
(B) TYPE: séquence peptidique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple brin
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Ile Thr Val Asp His Val Ala Gly Phe Thr Asn Leu Trp Asn Gly Ala
 5 10 15
Pro

(6) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 203 paires de bases
(B) TYPE: séquence nucléotidique
(C) NOMBRE DE BRINS: double brin
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: gène partiel de la fucanase

(iii) HYPOTHETIQUE: non

(iv) ANTI-SENS: non

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: CNRS, Station Biologique, Laboratoire de
Biologie cellulaire et moléculaire des algues, 29682
Roscoff Cedex
(B) SOUCHE: SW5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

ATTACGGTTG ATCATGTTGC AGGTTTTACT AATTTGGGTA ATGGAGCACC TGTTTGGTCT	060
TCACCTATAC TTAATCTTAC CGATGGAAAA GGATCATTCG CCTATAATTA TACTTTGCAA	120
TTAGGAACCG ATTATTATGA TTTTGAAGGT GATGCACTTA CTATTACTAA AACATCAGGA	180
CCTGATTGGC TCACCATTCA ACA	203

(7) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 67 acides aminés
- (B) TYPE: séquence protéique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple brin
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: non

(iv) ANTI-SENS: non

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: CNRS, Station Biologique, Laboratoire de
Biologie cellulaire et moléculaire des algues, 29682
Roscoff Cedex

(B) SOUCHE: SW5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Ile Thr Val Asp His Val Ala Gly Phe Thr Asn Leu Gly Asn Gly	15
Ala Pro Val Trp Ser Ser Pro Ile Leu Asn Leu Thr Asp Gly Lys	30
Gly Ser Phe Ala Tyr Asn Tyr Thr Leu Gln Leu Gly Thr Asp Tyr	45
Tyr Asp Phe Glu Gly Asp Ala Leu Thr Ile Thr Lys Thr Ser Gly	60
Pro Asp Trp Leu Thr Ile Gln	67

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC/FR 99/02243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07H3/06 C12P19/14 A01N63/02 C12N9/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07H C12P A01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 6, 31 July 1995 (1995-07-31) & JP 07 059563 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 7 March 1995 (1995-03-07) abstract & CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 21, 22 May 1995 (1995-05-22) Columbus, Ohio, US; abstract no. 259851, abstract	5
X	US 5 588 254 A (TAKASHI ADACHI ET AL.) 31 December 1996 (1996-12-31) column 8, line 5 - line 25; example 27 --- -/--	6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1999

Date of mailing of the international search report

24/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lensen, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 99/02243

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 11, 26 December 1995 (1995-12-26) & JP 07 215990 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 15 August 1995 (1995-08-15) abstract & DATABASE WPI Week 9541 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 317479</p> <p>-----</p>	

INTERNATIO SEARCH REPORT

International Application No

PC./FR 99/02243

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 07059563 A	07-03-1995	NONE	
US 5588254 A	31-12-1996	JP 1749151 C	08-04-1993
		JP 4033408 B	03-06-1992
		JP 63101302 A	06-05-1988
		JP 1892990 C	26-12-1994
		JP 6017282 B	09-03-1994
		JP 63215606 A	08-09-1988
		CA 1332880 A	08-11-1994
		CN 1020842 B	26-05-1993
		DE 3735365 A	21-04-1988
		FR 2605185 A	22-04-1988
JP 07215990 A	15-08-1995	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PC./FR 99/02243

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07H3/06 C12P19/14 A01N63/02 C12N9/14

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07H C12P A01N C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche ...

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 6, 31 juillet 1995 (1995-07-31) & JP 07 059563 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 7 mars 1995 (1995-03-07) abrégé & CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 21, 22 mai 1995 (1995-05-22) Columbus, Ohio, US; abstract no. 259851, abrégé	5
X	US 5 588 254 A (TAKASHI ADACHI ET AL.) 31 décembre 1996 (1996-12-31) colonne 8, ligne 5 - ligne 25; exemple 27 --- -/--	6

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cite pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 novembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24/11/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lensen, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dep. Internationale No
PCT/FR 99/02243

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 11, 26 décembre 1995 (1995-12-26) & JP 07 215990 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 15 août 1995 (1995-08-15) abrégé & DATABASE WPI Week 9541 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 317479</p> <p>-----</p>	

09/787714

JC03 REC'D PCT/PTO 21 MAR 2001

CERTIFICATION OF TRANSLATION

I, Gustave KOCH, of CABINET PLASSERAUD, 84, rue d'Amsterdam,
75440 PARIS CEDEX 09, FRANCE, do hereby declare that I am well
acquainted with the French and English languages, and verify that
the document attached is a true and correct literal English
language translation of the text of International Patent
Application no. PCT/FR99/02243.

Dated this 3 March 2001.



Gustave KOCH

10887
09/287714
Translation
SDCO

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BCT990058/GK	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02243	International filing date (<i>day/month/year</i>) 21 September 1999 (21.09.99)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 21 September 1998 (21.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07H 3/06		
Applicant LABORATOIRES GOEMAR S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 07 April 2000 (07.04.00)	Date of completion of this report 14 June 2000 (14.06.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02243

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-18, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-7, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/2-2/2, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02243

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

- D1: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Vol. 95, no. 6, 31 July 1995 (1995-07-31) & JP-A-07 059 563 (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 7 March 1995 (1995-03-07) & CHEMICAL ABSTRACTS, Vol. 122, no. 21, 22 May 1995 (1995-05-22) Columbus, Ohio, US; abstract no. 259851,
- D2: US-A-5 588 254 (TAKASHI ADACHI ET AL.) 31 December 1996 (1996-12-31),
- D3: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Vol. 95, no. 11, 26 December 1995 (1995-12-26) & JP-A-07 215 990 (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 15 August 1995 (1995-08-15) & DATABASE WPI Week 9541 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 317479.

2. The subject matter of the present application relates to endofucanases useful for preparing fuco-oligosaccharides by enzymatic hydrolysis of fucans, said endofucanases being prepared from a productive bacterium filed under the number 12171 in the collection "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH". The application also relates to sulfated fuco-oligosaccharides with a

degree of polymerization of 4 to 100 units of α -L fucose and the compositions containing same.

3. None of the documents cited in the international search report mentions fucanases obtained from a specific bacterial strain (see D1: origin of the fucanase: Echinoidea; D2: column 8, line 7: the origin of the enzyme is not indicated), or any bacterial strain producing said fucanase.

Furthermore, using sulfated fuco-oligosaccharides with a degree of polymerization of 4 to 100 units of α -L fucose for plant protection treatment is not disclosed in the above-mentioned prior art.

4. D3 mentions fuco-oligosaccharides having a molecular weight of around 5000 (which corresponds to around 20 units of fucose) included in a pharmaceutical composition, but does not disclose a composition for protecting plants (see the present Claim 6).
5. The subject matter of the present claims is therefore considered novel and inventive (PCT Article 33(2) and (3)).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire BCT990058/GK	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02243	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/09/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 21/09/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07H3/06		
Déposant LABORATOIRES GOEMAR S.A. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 07/04/2000	Date d'achèvement du présent rapport 14.06.2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé G. Willièrè N° de téléphone +49 89 2399 8548 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02243

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-18 version initiale

Revendications, N°:

1-7 version initiale

Dessins, feuilles:

1/2-2/2 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

3. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02243

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-7
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-7
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-7
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 6, 31 juillet 1995 (1995-07-31) & JP 07 059563 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 7 mars 1995 (1995-03-07) & CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 21, 22 mai 1995 (1995-05-22) Columbus, Ohio, US; abstract no. 259851,
D2: US-A-5 588 254 (TAKASHI ADACHI ET AL.) 31 décembre 1996 (1996-12-31)
D3: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 11, 26 décembre 1995 (1995-12-26) & JP 07 215990 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 15 août 1995 (1995-08-15) & DATABASE WPI Week 9541 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 317479

2. La présente demande a pour objet des endofucanases pour la préparation de fuco-oligosaccharides par hydrolyse enzymatique des fucanes, lesdites endofucanases étant préparées à partir d'une bactérie productrice déposée sous le n°12171 dans la collection "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). La demande vise aussi des fuco-oligosaccharides sulfatés ayant un degré de polymérisation de 4 à 100 unités de α -L fucose et des compositions les comprenant.
3. Aucun des documents cités dans le rapport de recherche international ne fait mention de fucanases obtenus à partir d'une souche bactérienne spécifique (voir D1: origine de la fucanase: Echinoidea; D2: colonne 8, ligne 7: l'origine de l'enzyme n'est pas indiqué), ni d'une souche bactérienne quelconque produisant cette fucanase.

D'autant plus l'utilisation pour le traitement de protection des plantes de fuco-oligosaccharides sulfatés ayant un degré de polymérisation de 4 à 100 unités de α -L fucose n'est pas divulguée dans l'état de la technique indiqué.

4. D3 mentionne des fuco-oligosaccharides ayant une masse moléculaire d'environ 5000 (ce qui correspond à environ 20 unités de fucose) compris dans une composition pharmaceutique, sans divulgué une composition pour la protection des plantes (voir la présente revendication 6).
5. L'objet des présentes revendications est donc considérer comme nouveau et inventif au sens de l'article 33(2) et 33(3) PCT.

PCT

REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réserve

ce récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)
(12 caractères au maximum) BCT990058/GK

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION Endofucanases et procédé les mettant en œuvre pour la préparation des oligo-oligosaccharides à partir des fucanes, bactérie productrice des endofucanases, gènes d'endofucanases et applications des fuc-oligosaccharides à la protection des plantes.

Cadre n° II DÉPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom: pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

LABORATOIRES GOEMAR S.A.
ZAC de la Madelaine
35400 SAINT MALO
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) :

FR

Domicile (nom de l'Etat) :

FR

Cette personne est déposant pour :

☐

tous les Etats désignés

☒

tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☐

les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐

les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom: pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

DESCAMPS Valérie
22 rue Yan d'Argent
29580 ROSCOFF
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

FR

Domicile (nom de l'Etat) :

FR

Cette personne est déposant pour :

☐

tous les Etats désignés

☐

tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☒

les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐

les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN: OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒

mandataire

☐

représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom: pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

KOCH Gustave
CABINET PLASSERAUD
84 rue d'Amsterdam
75440 PARIS CEDEX 09
FRANCE

n° de téléphone

01 44 63 41 11

n° de télécopieur

01 42 80 01 59

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

KLARSZINSKY Olivier
13 rue des Vosges
68740 FESSENHEIM
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

FR

Domicile (nom de l'État) :

FR

Cette personne est
déposant pour :

☐ tous les États
désignés☐ tous les États désignés sauf
les États-Unis d'Amérique☒ les États-Unis d'Amérique
seulement☐ les États indiqués dans
le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

BARBEYRON Tristan
30 rue de la Garenne
29233 CLEDER
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

FR

Domicile (nom de l'État) :

FR

Cette personne est
déposant pour :

☐ tous les États
désignés☐ tous les États désignés sauf
les États-Unis d'Amérique☒ les États-Unis d'Amérique
seulement☐ les États indiqués dans
le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

CLOAREC Bernard
Penn ar Feunteun
29420 PLOUENAN
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

FR

Domicile (nom de l'État) :

FR

Cette personne est
déposant pour :

☐ tous les États
désignés☐ tous les États désignés sauf
les États-Unis d'Amérique☒ les États-Unis d'Amérique
seulement☐ les États indiqués dans
le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

FRITIG Bernard
6 rue Hohwald
67460 SOUFFELWEYERSHEIM
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

FR

Domicile (nom de l'État) :

FR

Cette personne est
déposant pour :

☐ tous les États
désignés☐ tous les États désignés sauf
les États-Unis d'Amérique☒ les États-Unis d'Amérique
seulement☐ les États indiqués dans
le cadre supplémentaire☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

JOUBERT Jean-Marie
13 rue Gesril Du Papeu
35400 SAINT MALO
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
 (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

FR

Domicile (nom de l'État) :

FR

Cette personne est
déposant pour :☐ tous les États
désignés☐ tous les États désignés sauf
les États-Unis d'Amérique☒ les États-Unis d'Amérique
seulement☐ les États indiqués dans
le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

PLESSE Bertrand
23 rue Saint Erhard
67000 STRASBOURG
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
 (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

FR

Domicile (nom de l'État) :

FR

Cette personne est
déposant pour :☐ tous les États
désignés☐ tous les États désignés sauf
les États-Unis d'Amérique☒ les États-Unis d'Amérique
seulement☐ les États indiqués dans
le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

YVIN Jean-Claude
3 rue Gabriel Desgrés
35400 SAINT MALO
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
 (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

FR

Domicile (nom de l'État) :

FR

Cette personne est
déposant pour :☐ tous les États
désignés☐ tous les États désignés sauf
les États-Unis d'Amérique☒ les États-Unis d'Amérique
seulement☐ les États indiqués dans
le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom, pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
 (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

Domicile (nom de l'État) :

Cette personne est
déposant pour :☐ tous les États
désignés☐ tous les États désignés sauf
les États-Unis d'Amérique☐ les États-Unis d'Amérique
seulement☐ les États indiqués dans
le cadre supplémentaire☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées: une au moins doit l'être):

Brevet régional

- ☒ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☒ EA Brevet eurasién : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasién et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☒ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Émirats arabes unis | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanie | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Arménie | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lituanie |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Autriche | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettonie |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan | <input checked="" type="checkbox"/> MD République de Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbade | <input checked="" type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarie | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brésil | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolie |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Bélarus | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexique |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norvège |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN Chine | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Pologne |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ République tchèque | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Allemagne | <input checked="" type="checkbox"/> RO Roumanie |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Danemark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Fédération de Russie |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonie | <input checked="" type="checkbox"/> SD Soudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Espagne | <input checked="" type="checkbox"/> SE Suède |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finlande | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapour |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Royaume-Uni | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovénie |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenade | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovaquie |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Géorgie | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadjikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambie | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkménistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatie | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turquie |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hongrie | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonésie | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israël | <input checked="" type="checkbox"/> UG Ouganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Inde | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Islande | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirghizistan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yougoslavie |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud |
| | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR République de Corée | Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille : |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie | <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominique |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input checked="" type="checkbox"/> TZ Tanzanie |

Déclaration concernant les désignations de précaution : outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

Cadre n° VI REVENDICATIONS DE PRIORITÉ

☐ Les autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.

Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : office régional	demande internationale : office récepteur
(1) (21.09.1998) 21 Septembre 1998	98 11756	FRANCE		
(2)				
(3)				

☐ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) :

* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b.iii). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA / EP	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : Date (jour/mois/année) Numéro Pays (ou office régional) 2 Juillet 1999 FA 570791 France		
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--

Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT

La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant :	Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale :
requête : 5	1. <input checked="" type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes
description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 18	2. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé
revendications : 1	3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant :
abrégé : 1	4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature
dessins : 2	5. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) :
partie de la description réservée au listage des séquences : 4	6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) :
Nombre total de feuilles : 31	7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés
	8. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffable par ordinateur
	9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : Copie du rapport de recherche

Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :

Langue de dépôt de la demande internationale : Français

Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE

À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe.

Paris, le 21 septembre 1999

KOCH Gustave

Réservé à l'office récepteur

1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Réservé au Bureau international

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres des familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 99/02243

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 07059563 A	07-03-1995	AUCUN	
US 5588254 A	31-12-1996	JP 1749151 C JP 4033408 B JP 63101302 A JP 1892990 C JP 6017282 B JP 63215606 A CA 1332880 A CN 1020842 B DE 3735365 A FR 2605185 A	08-04-1993 03-06-1992 06-05-1988 26-12-1994 09-03-1994 08-09-1988 08-11-1994 26-05-1993 21-04-1988 22-04-1988
JP 07215990 A	15-08-1995	AUCUN	

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BCT990058/GK	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 02243	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/09/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année)) 21/09/1998
Déposant LABORATOIRES GOEMAR S.A. et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.



la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

- b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :



contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.



déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.



remise ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.



remise ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.



La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

endufucanases et procede les mettant en oeuvre pour la preparation des fuco-oligosaccharides a partir des fucanes, bacterie productrice des endofucanases et applications des fuco-oligosaccharides a la protection de plantes.

5. En ce qui concerne l'abrégé,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant



le text (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°



suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07H3/06 C12P19/14 A01N63/02 C12N9/14		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07H C12P A01N C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 6, 31 juillet 1995 (1995-07-31) & JP 07 059563 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 7 mars 1995 (1995-03-07) abrégé & CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 21, 22 mai 1995 (1995-05-22) Columbus, Ohio, US; abstract no. 259851, abrégé	5
X	US 5 588 254 A (TAKASHI ADACHI ET AL.) 31 décembre 1996 (1996-12-31) colonne 8, ligne 5 - ligne 25; exemple 27 --- -/--	6
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
17 novembre 1999		24/11/1999
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Fonctionnaire autorisé Lensen, H

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 11, 26 décembre 1995 (1995-12-26) & JP 07 215990 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 15 août 1995 (1995-08-15) abrégé & DATABASE WPI Week 9541 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 317479</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Recherche Internationale No

PCT/FR 99/02243

Document brevet cité au rapport de recherche	Date d publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 07059563 A	07-03-1995	AUCUN	
US 5588254 A	31-12-1996	JP 1749151 C JP 4033408 B JP 63101302 A JP 1892990 C JP 6017282 B JP 63215606 A CA 1332880 A CN 1020842 B DE 3735365 A FR 2605185 A	08-04-1993 03-06-1992 06-05-1988 26-12-1994 09-03-1994 08-09-1988 08-11-1994 26-05-1993 21-04-1988 22-04-1988
JP 07215990 A	15-08-1995	AUCUN	

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 570791
FR 9811756

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 6, 31 juillet 1995 α & JP 07 059563 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 7 mars 1995 * abrégé * & CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 21, 22 mai 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 259851, * abrégé *	1-4
X	α US 5 588 254 A (TAKASHI ADACHI ET AL.) 31 décembre 1996 * colonne 8, ligne 5 - ligne 25; exemple 27 *	1,5,6
X	α PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 11, 26 décembre 1995 & JP 07 215990 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 15 août 1995 * abrégé * & DATABASE WPI Week 9541 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 317479	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.5)
		C07H C12P A01N C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
2 juillet 1999		Lensen, H
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO.**

FA 570791
FR 9811756

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.
ni de l'Administration française

02-07-1999

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5588254 A	31-12-1996	JP 1749151 C	08-04-1993
		JP 4033408 B	03-06-1992
		JP 63101302 A	06-05-1988
		JP 1892990 C	26-12-1994
		JP 6017282 B	09-03-1994
		JP 63215606 A	08-09-1988
		CA 1332880 A	08-11-1994
		CN 1020842 B	26-05-1993
		DE 3735365 A	21-04-1988
		FR 2605185 A	22-04-1988
<hr/>			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC./FR 99/02243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07H3/06 C12P19/14 A01N63/02 C12N9/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07H C12P A01N C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 6, 31 July 1995 (1995-07-31) & JP 07 059563 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 7 March 1995 (1995-03-07) abstract & CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 122, no. 21, 22 May 1995 (1995-05-22) Columbus, Ohio, US; abstract no. 259851, abstract	5
X	US 5 588 254 A (TAKASHI ADACHI ET AL.) 31 December 1996 (1996-12-31) column 8, line 5 - line 25; example 27 --- -/--	6

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 November 1999

Date of mailing of the international search report

24/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Lensen, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02243

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 95, no. 11, 26 December 1995 (1995-12-26) & JP 07 215990 A (TOUSA KOGAKU KENKYUSHO), 15 August 1995 (1995-08-15) abstract & DATABASE WPI Week 9541 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 317479</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PL./FR 99/02243

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 07059563 A	07-03-1995	NONE	
US 5588254 A	31-12-1996	JP 1749151 C	08-04-1993
		JP 4033408 B	03-06-1992
		JP 63101302 A	06-05-1988
		JP 1892990 C	26-12-1994
		JP 6017282 B	09-03-1994
		JP 63215606 A	08-09-1988
		CA 1332880 A	08-11-1994
		CN 1020842 B	26-05-1993
		DE 3735365 A	21-04-1988
		FR 2605185 A	22-04-1988
JP 07215990 A	15-08-1995	NONE	